

УДК 579.84

**В.А. Романовская¹, Н.Л. Белькова², В.В. Парфенова²,
Г.В. Гладка¹, Ф.В. Мучник¹, А.Б. Таширев¹**

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины им. Д. К. Заболотного,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Федеральное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН,
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, РФ

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Цель. Провести филогенетический анализ и уточнить таксономическое положение коллекционных штаммов метанокисляющих бактерий (метанотрофов). **Методы.** Объекты исследования – 22 штамма облигатных метанотрофов, которые хранились в Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ). Морфолого-физиологические свойства бактерий изучали стандартными методами. Путь ассимиляции метана устанавливали, определяя в бесклеточных экстрактах метанотрофов ключевые ферменты метаболизма C_1 -соединений. Филогенетическое положение определяли построением дендрограмм на основе генов 16S рРНК метанотрофов, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (пакеты программ ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) с использованием метода ближайших соседей. **Результаты.** Исследованные штаммы представлены семействами *Methylococcaceae* (род *Methylobacter*) и *Methylocystaceae* (рода *Methylocystis* и *Methylosinus*). Учитывая результаты филогенетического анализа и их фенотипические свойства, они отнесены к видам *Methylobacter marinus* (5 штаммов), *M. luteus* (1 штамм), *Methylosinus trichosporium* (3 штамма), *Methylocystis rosea* (2 штамма), *M. hirsuta* (1 штамм). На филогенетическом дереве девять исследованных штаммов *Methylobacter* образовали два отдельных кластера, которые отличаются также по фенотипическим признакам от известных видов и поэтому могут представлять новые виды. **Выводы.** Филогенетический и фенотипический анализы позволили уточнить таксономическое положение 22-х коллекционных штаммов метанотрофов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: облигатные метанокисляющие бактерии, сиквенс генов 16S рРНК, филогенетический анализ, таксономическое положение.

Метанокисляющие бактерии (метанотрофы) являются единственными биокаталитическими системами, которые утилизируют метан биологического и геохимического происхождения, являясь своеобразным биофильтром, который препятствует избыточному поступлению метана в атмосферу. Благодаря своей уникальности метанотрофы активно исследуют с 1960-х годов. В Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ) хранятся 50 изолированных нами штаммов метанотрофов и 17 штаммов, полученных от других исследователей (R. Whittenbury, Великобритания, 1984 г; J. Neuber, Германия, 1991 г.). Это значительно превышает количество метанотрофов, которое имеется в других известных коллекциях. Проведенная нами ревизия таксономии метанотрофов из УКМ привела к необходимости уточнить таксономическое положение 22-х штаммов. Для этого использовали филогенетический и фенотипический анализ.

Материалы и методы исследования. *Объекты исследования* – коллекционные штаммы облигатных метанотрофов, которые поддерживаются в УКМ. Список исследованных штаммов и их происхождение представлены в таблице 1. Для выращивания штаммов использовали минеральную агаризованную среду К (г/л): KNO_3 – 1.0 (или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1.2, KH_2PO_4 – 1.2, NaCl – 0.9, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.9, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.003. В среду вносили микроэлементы (мкг/л): $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 200, H_3BO_3 – 10, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 70, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 10, а также агар Difco (20 г/л), pH 6.8–7.0. Инокулированные бактериями чашки помещали в хроматографические сосуды, которые герметизировали при помощи металлической крышки, оборудованной двумя штуцерами для ввода и выхода газовой смеси. Сосуды заполняли приготовленной в газометре газовой смесью метан:воздух (1:1–1:4) и помещали в термостат при 30°C. Смену газовой фазы в сосуде осуществляли через каждые двое суток. Время роста культур 7–10 суток [3].

Таблица 1

Список штаммов метанотрофов, использованных в работе, и их происхождение

№ штамма	Происхождение: биотоп, из которого выделен штамм
UCM В-3004	Ил искусственного пруда, Украина
UCM В-3017	Ил эвтрофного озера, Украина
UCM В-3019	Почва заливного луга, Украина
UCM В-3020	Почва нефтяного месторождения, Германия
UCM В-3027	Ил заливного луга, Украина
UCM В-3029	Ил, пойма реки Днепр, Украина
UCM В-3034	Осадок Балтийского моря, Германия
UCM В-3049	Почва газового месторождения, Украина
UCM В-3057	Ил пресного водоема, Украина
UCM В-3087	Ил эвтрофного озера, Украина
UCM В-3090	Ил реки Днепр, Украина
UCM В-3102	Ил эвтрофного озера, Украина
UCM В-3115	Ил искусственного водохранилища, Украина
UCM В-3121	Ил искусственного водохранилища, Украина
UCM В-3160	Почва газового месторождения, Украина
UCM В-3161	Почва газового месторождения, Украина
UCM В-3183	Сточные воды метатенка, Украина
UCM В-3184	Ил пруда на нефтяном месторождении, Германия
UCM В-3226	Ил сточных вод железорудной шахты, Украина
UCM В-3405	Ил умеренно солёного залива Чёрного моря, Украина
UCM В-3421	Вода из пруда на нефтяном месторождении, Германия
UCM В-3422	Вода из пруда на нефтяном месторождении, Германия

Примечание. Некоторые штаммы были получены в 1991 г. от J. Neueg (Германия): IA20d/1 (=UCM В-3020), IF23c/3 (=UCM В-3184), IA21c/1 (=UCM В-3421), IB21c/5b (=UCM В-3422). UCM (=УКМ) – Украинская коллекция микроорганизмов.

Морфолого-физиологические свойства. Морфологию клеток метанотрофов изучали, микроскопируя окрашенные по Граму и живые клетки, методами, описанными в работах [11, 12, 15]; наличие покоящихся форм (цист и спор), устойчивость к высушиванию и нагреванию определяли по [14]. В ростовых опытах определяли способность метанотрофов расти при значениях рН в диапазоне от 4.0 до 10.0; при различных температурах в диапазоне от 10°C до 50°C; толерантность к NaCl при концентрациях от 0.2 до 5.0% (вес/объем); способность ассимилировать в качестве единственного источника углеродного питания сахара, спирты и аминокислоты (арабиноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, лактоза, мальтоза, манноза, рамноза, раффиноза, сахароза, фруктоза, дульцит, инозит, маннит, сорбит, аланин, фенилаланин, лейцин, пролин и др.), добавляя 0.5% (вес/объем) органического соединения в минеральную среду К. Жирнокислотный состав метанотрофов изучали методом газожидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот [2]. Электрофорез клеточных белков клеток метанотрофов проводили газохроматографическим методом [6], содержание ГЦ в ДНК определено ранее [7, 11, 12].

Энзимологический анализ. Путь ассимиляции метана устанавливали, определяя в бесклеточных экстрактах метанотрофов ключевые ферменты биосинтетического метаболизма C₁-соединений: гексулозофосфатсинтазу (ГФ), серин-глиоксилатаминотрансферазу (СГАТФ) и оксипируватредуктазу (ОПР) [9]. Наличие ГФ свидетельствовало о функционировании рибулозомонофосфатного (РМФ) пути включения формальдегида в метаболизм (семейство *Methylococcaceae*); наличие СГАТФ, катализирующей образование оксипирувата из L-серина (зависящее от глиоксилата), и ОПР, катализирующей превращение оксипирувата в глицерат, свидетельствовало о функционировании серинового цикла включения формальдегида в метаболизм (семейство *Methylocystaceae*).

Выделение геномной ДНК. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью коммерческого набора ДНК-сорб Б по прилагаемым к наборам инструкциям производителя (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Аmplификацию препаратов ДНК исследованных бактерий проводили с коммерческим набором N-Taq (НТИ-Байкал, Иркутск) с консервативными бактериальными праймерами 27L (5'-3': AGAGTTTGATCATGGCTCAG) и 1542R (5'-3': САКАААGGAGGTGATCC) [8]. Использовали следующий режим реакции: в первом цикле денатурация при 95°C – 5 мин, затем 30 циклов: денатурация 94°C – 30 с, отжиг 58°C – 30 с и элонгация 72°C – 90 с, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 7 мин. Амплификацию проводили в термоциклере Бис (БИС-Н, Россия). Ампликоны анализировали в агарозном гель-электрофорезе, визуализировали на трансиллюминаторе [1]. Сиквенсную реакцию вели с набором BigDye® Terminator (Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Последовательности генов 16S рРНК метанотрофных изолятов депонировали в международной базе данных GenBank под номерами LT220828–LT220849. Длина нуклеотидных последовательностей фраг-

ментов генов 16S рРНК, которые исследовались у метанотрофных изолятов, составляла 1380–1420 п.н.

Филогенетический анализ. Полученные последовательности фрагментов 16S рРНК бактериальных изолятов сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank, используя пакет программ BLAST. Филогенетический анализ проводили при построении дендрограмм, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (пакеты программ ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) с использованием метода ближайших соседей.

Результаты и обсуждение. Как следует из данных, представленных в таблице 1, исследованные штаммы метанотрофов были изолированы, как правило, из биотопов, в которых имеется метан биологического или геохимического происхождения. Эти изоляты более 30 лет поддерживались в УКМ и их идентификация была крайне затруднена в связи с тем, что они облигатно ассимилируют только метан, это ограничивает использование большинства общепринятых тестов для идентификации [11, 12].

Все исследованные штаммы – грамотрицательные бактерии, мезофильные (растут в диапазоне температур 15–37°C, оптимум 28–30°C, не растут или очень слабо растут при 10°C), нейтрофильные (растут в диапазоне рН 5.5–8.0, оптимум 6.8–7.2), аэробные бактерии. Они являются облигатными метанотрофами, так как используют в качестве источника углеродного питания только метан. Не способны расти на других органических соединениях, более того, многоуглеродные вещества, особенно белковой природы, ингибируют их рост на метане [11]. Растут на минеральных средах, не требуют ростовых факторов.

Таксономическое положение исследованных штаммов семейства Methylococcaceae. Основные свойства 15-ти штаммов приведены ранее в работах [11, 12]. Форма бактерий – палочко-кокковые полиморфные клетки, размеры варьируют (от 0.6×1.0 до 1.5×4.0 мкм), грамотрицательные, спор не образуют, покоящиеся формы – цисты. Энзимологический анализ показал высокую активность гексулозофосфатсинтазы (ГФ) (400–1200 нМ субстрата / мг белка / мин), ключевого фермента рибулозомонофосфатного (РМФ) пути включения формальдегида в метаболизм; и очень низкую активность, либо отсутствие активности ключевых ферментов серинового пути: серин-глиоцилатаминотрансферазы и оксипируватредуктазы (0–7.4 и 0–6.5 нМ субстрата/ мг белка /мин, соответственно). Высокая активность ГФ свидетельствовала о функционировании РМФ пути метаболизма метана [4, 12]. Преобладали мононенасыщенные жирные кислоты с 16 атомами углерода; система внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) была I-го типа (стопки уплощенных везикул, заполняющих большую часть содержимого клетки) [12]. На основании этих признаков исследуемые штаммы были причислены к семейству *Methylococcaceae*. Поскольку дальнейшая идентификация метанотрофов по фенотипическим признакам затруднена, мы использовали филогенетический анализ на основе генов 16S рРНК.

На основании высокого сходства (98.3–99.9%) (табл. 2) генов 16S рРНК группы исследованных метанотрофов (UCM B-3017, UCM B-3019, UCM B-3027, UCM B-3102, UCM B-3121, UCM B-3226, UCM B-3405,

Таблица 2

Виды, которые были близкородственными для исследованных метанотрофов из Украинской коллекции микроорганизмов (UCM) на основании попарного сходства сиквенсов генов 16S рРНК, согласно программе BLASTN

Исследованные штаммы	Виды, близкородственные исследованным штаммам	
	GenBank accession No, вид, № штамма	Сходство, %
UCM B-3017	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5
UCM B-3027	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.4
UCM B-3029	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	98.4
UCM B-3049	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	99.4
UCM B-3057	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB11914	99.6
UCM B-3087	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	99.4
UCM B-3102	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5
UCM B-3115	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	98.2
UCM B-3121	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5
UCM B-3160	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	99.5
UCM B-3161	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	99.2
UCM B-3184	NR_025132 <i>Methylobacter marinus</i> A45	99.6
UCM B-3226	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5
UCM B-3405	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5
UCM B-3004	NR_044947 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	99.5
UCM B-3034	NR_042108 <i>Methylocystis rosea</i> DSM 17261	99.9
UCM B-3421	NR_044947 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	99.5
UCM B-3020	NR_044947 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	99.2
UCM B-3422	NR_042108 <i>Methylocystis rosea</i> DSM 17261	99.9
UCM B-3183	NR_043754 <i>Methylocystis hirsuta</i> DSM 18500	99.7
UCM B-3090	NR_043754 <i>Methylocystis hirsuta</i> DSM 18500	98.7
UCM B-3019	NR_041814 <i>Methylobacter luteus</i> NCIMB 11914	98.5

Примечание. Жирным шрифтом обозначено сходство (%), выше 99.2), которое далее было подтверждено на дендрограммах.

UCM B-3087, UCM B-3049, UCM B-3057, UCM B-3161, UCM B-3160, UCM B-3184, UCM B-3029 и UCM B-3115) с близкородственными видами они также были причислены к семейству *Methylococcaceae* и однозначно отнесены к роду *Methylobacter*.

При филогенетическом анализе штаммов, отнесенных к роду *Methylobacter* (рис. 1), часть изолятов (UCM B-3087, UCM B-3049, UCM B-3161, UCM B-3160, UCM B-3184) кластеризовалась с *Methylobacter marinus*, один изолят (UCM B-3057) – с *Methylobacter luteus*. Коэффициенты сходства этих штаммов с близкородственными видами *M. marinus* или *M. luteus* составляли 99.2–99.6% (табл. 2). Фенотипически эти изоляты также подобны описанию видов, соответственно *M. marinus* или *M. luteus*, согласно руководства [5], поэтому они могут быть отнесены к данным видам.

Другие штаммы *Methylobacter* образовали два отдельных кластера (рис. 1, кластер 1 и 2). Кластер 1 объединил мезофильные, нейтрофильные, аэробные бактерии, которые представлены штаммами UCM B-3029 и UCM B-3115. По морфолого-культуральным свойствам эти бактерии отличаются от близкородственных видов *M. marinus* и *M. luteus*, а также от штаммов кластера 2 следующими признаками: клетки подвижны,

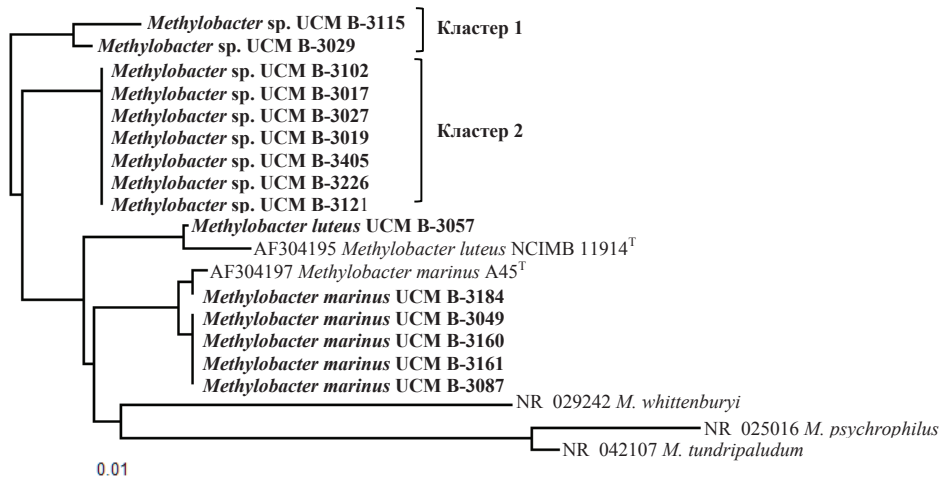


Рис. 1. Филогенетическое дерево для представителей рода *Methylobacter* (семейство *Methylococcaceae*), построенное методом объединения ближайших соседей (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК. Последовательности коллекционных штаммов из УКМ, анализируемые в данной работе, выделены жирным шрифтом. В анализ были включены также последовательности типовых штаммов видов *Methylobacter*. Масштаб соответствует 1 замене на 100 п.н.

длинные палочки (1.1–1.8×2.0–4.5 мкм), синтезируют ярко-оранжевый пигмент, не диффундирующий в среду, нет потребности в ростовых факторах. Другие признаки соответствовали описанию рода *Methylobacter*, приведенному в работах [5, 7]. Коэффициенты сходства штаммов UCM B-3029 и UCM B-3115 с близкородственными видами *M. marinus* или *M. luteus*, составляли 98.1–98.5 (табл. 2). На данном этапе исследования эти штаммы можно рассматривать как *Methylobacter* sp.

Кластер 2 объединил клетки семи штаммов метанотрофов (UCM B-3017, UCM B-3019, UCM B-3027, UCM B-3102, UCM B-3121, UCM B-3226, UCM B-3405) (рис. 1). Это неподвижные, овальные палочки (1–1.3×1.8–3 мкм), полиморфные. Колонии от белых до бурых (при старении культуры), пигмент не диффундировал в среду. Мезофильные, нейтрофильные, аэробные бактерии. Чётких результатов относительно наличия уреазы нами не было получено (признак не стабилен), так как мочевины (5–20 г/л), которая является необходимым компонентом теста на уреазу, ингибировала рост исследованных метанотрофов. Другие физиолого-биохимические признаки – такие же, как описано выше для семейства *Methylococcaceae*. Признаки соответствуют описанию рода *Methylobacter*, приведенному в руководстве [5]. По морфолого-культуральным свойствам эти бактерии отличаются от близкородственных видов *M. marinus* и *M. luteus*, с которыми коэффициенты попарного сходства составляют более 98% (табл. 2). В отличие от *M. luteus*, у них светло-бурые колонии пастообразной консистенции, клетки кокковидной или овально-палочковидной формы, у них нет потребности в ростовых факторах, содержание ГЦ в ДНК составляло 47.5–49.4 мол%. От *M. marinus* исследованные семь штаммов отличались отсутствием подвижности клеток, пигментацией, у них нет потребности в ростовых факторах, содержание ГЦ в ДНК составляло 47.5–49.4 мол%. Предварительно они отнесены к

не валидированному виду “*Methylobacter ucrainicus*” [11, 12]. Таксономическое положение: *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Methylococcales*, *Methylococcaceae*, *Methylobacter*.

Исследованные штаммы *Methylobacter* филогенетически удалены от других видов данного рода (*M. whittenburyi*, *M. psychrophilus*, *M. tundripaludum*) (рис. 1), а также отличаются от них по фенотипическим признакам (форма клетки, пигментация, оптимальная температура роста и др.). Коэффициенты попарного сходства исследованных штаммов с *M. whittenburyi*, *M. psychrophilus*, *M. tundripaludum* составляли 96–97% и менее, поэтому они не могут быть отнесены к этим видам.

Таксономическое положение исследованных штаммов Methylosinus и Methylocystis (семейство Methylocystaceae). Свойства штаммов UCM В-3004, UCM В-3020, UCM В-3421, UCM В-3034 и UCM В-3422, UCM В-3183, UCM В-3090 приведены ранее в работах [11, 12]. Эти штаммы используют в качестве источника углеродного питания только метан. Энзимологический анализ показал высокую активность ключевых ферментов серинового пути: серин-глиоксилатаминотрансферазы и оксипируватредуктазы (160–300 и 600–1200 нМ субстрата/мг белка/мин, соответственно). Ключевой фермент РМФ пути ассимиляции метана (ГФ) отсутствовал. Высокая активность СГАТФ и ОПР, а также отсутствие ГФ свидетельствовали о функционировании у них серинового пути ассимиляции метана [4, 12]. У этих штаммов преобладали мононенасыщенные жирные кислоты с 18 атомами углерода, выявлена система внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) II-го типа (несколько слоев мембран, расположенных параллельно клеточной стенке) [12]. На основании фенотипического и филогенетического анализа, сходства их генов 16S рРНК с таковыми близкородственных видов (99.2–99.9%, исключение UCM В-3090) (табл. 2) эти штаммы были причислены к семейству *Methylocystaceae* (представлены родами *Methylocystis* и *Methylosinus*).

При филогенетическом анализе три штамма (UCM В-3004, UCM В-3020, UCM В-3421) образовали общий кластер с типовым штаммом *Methylosinus trichosporium*, два штамма (UCM В-3034 и UCM В-3422) – с *Methylocystis rosea*, штамм UCM В-3183 – с *M. hirsuta* (рис. 2). Коэффициенты сходства генов 16S рРНК штаммов UCM В-3004, UCM В-3020, UCM В-3421 с таковым близкородственного вида *Methylosinus trichosporium* составляли 99.2–99.5%; UCM В-3034 и UCM В-3422 с *Methylocystis rosea* – 99.9%; UCM В-3183 с *Methylocystis hirsuta* – 99.7%. По фенотипическим признакам испытуемые штаммы соответствуют описанию вышеуказанных видов в определителе [5], или в статьях [7, 10, 11, 13, 15]. На основании представленных результатов исследованные метанотрофы могут быть отнесены к видам *Methylosinus trichosporium* (штаммы UCM В-3004, UCM В-3020, UCM В-3421), *Methylocystis rosea* (штаммы UCM В-3034 и UCM В-3422), *M. hirsuta* (штамм UCM В-3183). Их таксономическое положение: *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Rhizobiales*, *Methylocystaceae*, *Methylocystis* или *Methylosinus*.

Штамм UCM В-3090 занимает обособленное положение среди видов *Methylocystis* на филогенетическом дереве (рис. 2), попарное сходство с близкородственными видами *Methylocystis rosea*, *M. hirsuta* составляло 98.6% (табл. 2). Его ближайшие гомологи относятся к неидентифици-

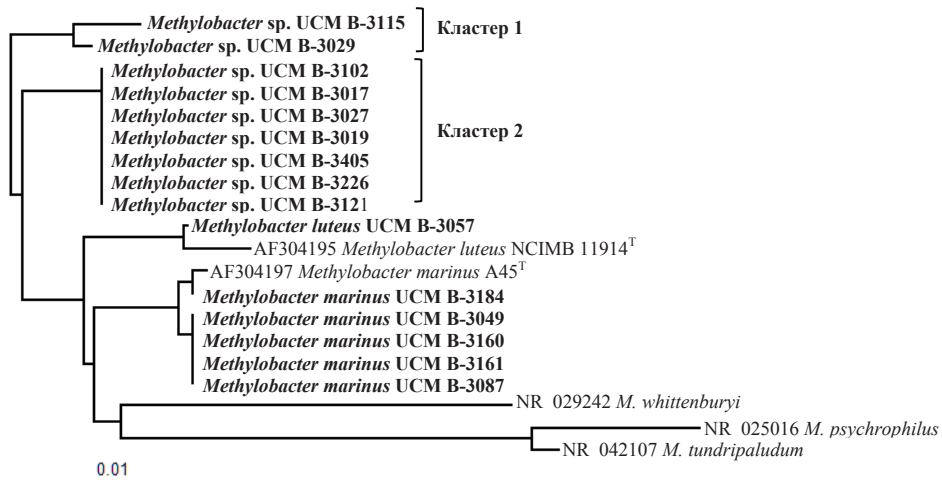


Рис. 2. Філогенетическе дерево представителів родів *Methylosinus* і *Methylocystis* (семейство *Methylocystaceae*), побудоване методом об'єднання найближчих сусідів (програми ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) на основі даних про послідовності фрагментів гена 16S рРНК. Послідовності колекційних штамів з УКМ, аналізовані в даній роботі, виділені жирним шрифтом. В аналіз були включені послідовності типових штамів відповідних видів і не ідентифіковані представителі роду *Methylocystis*. Масштаб відповідає 5 замінам на 1000 п.н. Бутстреп аналіз проведений для 1000 реплік; значення менше 85% на дендрогамі не представлені.

риваним до виду метанотрофам, ізолюваним з різних екосистем (AJ458472, AJ458479). Поєтому штам UCM B-3090 можна розглядати як *Methylocystis* sp.

Таким чином, досліджені колекційні штамми метанотрофів на основі філогенетического аналізу, високого схожості їх генів 16S рРНК з близькородственними видами (99.2–99.9%), а також урахувавши їх фенотипіческіє властивості, можуть бути віднесені до видів *Methylobacter marinus* (5 штамів), *M. luteus* (1 штам), *Methylosinus trichosporium* (3 штам), *Methylocystis rosea* (2 штам), *M. hirsuta* (1 штам). На філогенетическому дереві дев'ять досліджених штамів в кластері *Methylobacter* утворили два окремі кластери, які відрізняються також за фенотипіческіє ознаками від відомих видів і поєтому можуть представляти нові види.

**В.О. Романовська¹, Н.Л. Белькова², В.В. Парфенова²,
Г.В. Гладка¹, Ф.В. Мучник¹, А.Б. Таширеві¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, Україна

²Лімнологічний інститут Сибірського відділення РАН,
вул. Улан-Баторська, 3, Іркутськ, РФ

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ КОЛЕКЦІЙНИХ ШТАМІВ МЕТАНОКИСЛЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ

Резюме

Мета. Провести філогенетичний аналіз і уточнити таксономічне положення колекційних штамів метанокислюючих бактерій (метанотрофи). **Методу.** Об'єкти до-

слідження – 22 штами облігатних метанотрофів, які зберігалися в Українській колекції мікроорганізмів (УКМ). Морфолого-фізіологічні властивості бактерій вивчали стандартними методами. Шлях асиміляції метану встановлювали, визначаючи в безклітинних екстрактах метанотрофів ключові ферменти метаболізму C_1 -сполук. Філогенетичне положення визначали побудовою дендрограм на основі генів 16S рРНК метанотрофів, що показують положення досліджуваного штаму серед близькоспоріднених і типових видів (пакети програм ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) з використанням методу найближчих сусідів. **Результати.** Досліджені штами представлені родинами *Methylococcaceae* (рід *Methylobacter*) і *Methylocystaceae* (роди *Methylocystis* і *Methylosinus*). З огляду на результати філогенетичного аналізу і їх фенотипові властивості, вони віднесені до видів *Methylobacter marinus* (5 штамів), *M. luteus* (1 штама), *Methylosinus trichosporium* (3 штами), *Methylocystis rosea* (2 штами), *M. hirsuta* (1 штама). На філогенетичному дереві 9 досліджених штамів *Methylobacter* утворили два окремих кластера, які відрізняються також за фенотиповими ознаками від відомих видів і тому можуть становити нові види. **Висновки.** Філогенетичний і фенотиповий аналізи дозволили визначити таксономічне положення колекційних штамів метанотрофів.

Ключові слова: облігатні метанокислюючі бактерії, сиквенс генів 16S рРНК, філогенетичний аналіз, таксономічне положення.

**V.A. Romanovskaya¹, N.L. Belkova², V.V. Parfenova²,
G.V. Gladka¹, Ph.V. Muchnyk¹, O.B. Tashyrev¹**

¹Zabolotny Institute of microbiology and virology of National academy of sciences of Ukraine
Ukraine, D 03680, Kyiv, Zabolotny str., 154

²Linnological Institute SD RAS, Russia, 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE COLLECTION STRAINS OF METHANE OXIDIZING BACTERIA

Summary

Aim. Perform phylogenetic analysis to determine the taxonomic position of the collection strains of methane oxidizing bacteria (methanotrophs). **Methods.** Objects of research – 22 strains of obligate methanotrophs that were stored in the Ukrainian collection of microorganisms (UCM). Morphological and physiological properties of bacteria were studied by standard methods. Way methane assimilation established by determining in cell-free extracts of methanotrophs key enzymes of metabolism of C_1 compounds. Phylogenetic position is determined construction of phylogenetic trees based on 16S rRNA genes methanotrophs showing the position of the strain among closely related and type species (software packages ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) using the method of nearest neighbors. **Results.** The studied strains presented the families of *Methylococcaceae* (genus *Methylobacter*) and *Methylocystaceae* (genus *Methylocystis* and *Methylosinus*). According to phylogenetic and phenotypic analyzes they belong to the species *Methylobacter marinus* (5 strains), *M. luteus* (1 strain), *Methylosinus trichosporium* (3 strains), *Methylocystis rosea* (2 strains), *M. hirsuta* (1 strain). Nine strains of *Methylobacter* formed on the phylogenetic tree two separate clusters. These strains also differ by phenotypic characteristics from known species and, therefore, may represent new species. **Conclusions.** Phylogenetic and phenotypic analyzes have allowed to clarify the taxonomic status of collection methanotrophs strains.

Keywords: obligate methane-oxidizing bacteria, genes 16S rRNA, phylogenetic analysis, the taxonomic position.

1. Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // В кн. Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. / Под ред. Андреевой А.М. Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – С. 53–63.
2. Гальченко В.Ф., Андреев Л.В., Троценко Ю.А. Таксономия и идентификация облигатных метанотрофных бактерий / Пушино: НЦБИ АН СССР, 1986. – 96 с.
3. Малащенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метаноокисляющие микроорганизмы / Москва: Наука, 1978. – 209 с.
4. Шишкина В. И., Юрченко В. В., Романовская В.А., Малащенко Ю.Р, Троценко Ю.А. Об альтернативности путей ассимиляции метана у облигатных метилотрофов // Микробиология. – 1976. – 45, № 3. – С. 417–419.
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. The Proteobacteria. Parts B / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Editor-in-chief G.M. Garrity. New York, NY: Springer, 2nd ed., 2005. – 1106 p.
6. Gal'chenko V.F., Nesterov A.I. Numerical analysis of protein electrophoretograms of obligate methanotrophic bacteria // Microbiology (Mikrobiologiya). – 1981. – 50, № 6. – P. 725-730.
7. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised Taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., Emedation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1993. – 43, № 4. – P. 735–753.
8. Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., Noller H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. –1981. – 148. – P. 107–127.
9. Lawrence A.J., Quayle J.R. Alternative carbon assimilation pathways in methane-utilizing bacteria // J. Gen. Microbiol. – 1970. – 63, № 3. – P. 371–374.
10. Lindner A.S., Pacheco A., Aldrich H.C., Costello Staniec A., Uz I. Hodson D.J. *Methylocystis hirsuta* sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwaer aquifer // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – 57, № 8. – P. 1891–1900.
11. Romanovskaya V.A., Malashenko Yu.R., Bogachenko V.N. Corrected diagnoses of the genera and species of methane-utilizing bacteria // Microbiology (Mikrobiologiya). – 1978. – 47, № 1. – P. 96–103.
12. Romanovskaya V.A. Taxonomy of methylotrophic bacteria // Biology of Methylotrophs / Eds. I. Goldberg, J.S. Rokem. Boston, London: Butterworth-Heinemann, 1991. – P. 3–23.
13. Wartainen I., Hestnes A.G., McDonald I.R., Svenning M.M. *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78 degrees N) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – 56, № 3. – P. 541–547.
14. Whittenbury R., Davies S.L., Davey J.F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria // J. Gen. Microbiol. – 1970. – 61, № 2. –P. 219–226.
15. Whittenbury R., Phillips K.C. Wilkinson J.F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria // J. Gen. Microbiol. – 1970. – 61, № 2. – P. 205–218.

Отримано 27.07.2016